

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00924

研究課題名(和文)リピート配列を特異的に化学修飾するリピート結合分子の創成

研究課題名(英文)Creation of repeat binding molecules that specifically modify repeat sequences chemically

研究代表者

中谷 和彦 (Nakatani, Kazuhiko)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：70237303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発したリピート短縮効果は、転写の際に形成されるスリップアウト構造を固定することで、DNA修復因子による認識に影響を及ぼし、結果としてリピート長が短くなると考えられた。このことに着想を得て、「異常伸長した(CXG)_nリピートの短縮誘導を加速する新規リピート結合分子」の開発を目的とした。CGGリピート結合分子をモデルに求電子活性なエポキシ基をもつNCD-epoxyを合成したが、化学的に不安定であった。一方、シトシンデアミナーゼであるAPOBECファミリー蛋白質を用いることにより、リピート配列上のシトシンが基質となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脆弱X症候群、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィーなどのリピート病は、ヒトゲノム中のリピート配列の異常伸長や異常挿入を原因とする遺伝性の神経変性疾患であり、リピート伸長抑制による発症抑制等の根治療法や症状緩和等のQOL改善法が待ち望まれている。本研究はこれら不治の疾患に対する治療介入の手法として、リピート結合分子の効果を基礎化学的な側面から検討したものである。今回合成した分子には化学的な安定性と高い化学反応性という相反する性質が求められたため、望む化合物を得ることはできなかったが、より精緻な分子設計により克服することができれば、難治性疾患に悩む多くの方の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The repeat shortening effect we developed was thought to be due to the fixation of the slip-out structure formed during transcription, which affects recognition by DNA repair factors and results in shorter repeat lengths. Inspired by this idea, we aimed to develop "a novel repeat-binding molecule that accelerates the induction of shortening of abnormally elongated (CXG)_n repeats." Using the CGG repeat-binding molecule as a model, we synthesized NCD-epoxy with an electrophilically active epoxy group, but it was chemically unstable. On the other hand, by using APOBEC family proteins, which are cytosine deaminases, we found that cytosine on the repeat sequence can be used as a substrate.

研究分野：化学生物学

キーワード：リピート病 結合分子 化学修飾 修復酵素

1. 研究開始当初の背景

脆弱X症候群、ハンチントン病、筋強直性ジストロフィーなどのリピート病(図1)は、ヒトゲノム中のリピート配列の異常伸長や異常挿入を原因とする遺伝性の神経変性疾患である。「リピートの長さ」が長いほど「発症年齢」が低下し、「症状」が重篤になるなど、リピート長と病態が直接に関連するため、リピート伸長抑制による発症抑制等の根治療法の開発はもちろんのこと、リピート短縮による症状緩和等のQOL改善法が待ち望まれている。平成26年度に開始した特別推進研究「リピート結合分子をプローブとしたトリヌクレオチドリピート病のケミカルバイオロジー研究」において、リピート結合分子の開発とその効果を検討した結果、ハンチントン病モデルマウスの脳線条体への分子「ナフチリジンアザキノロン (NA)」の直接投与によるCAGリピートの短縮効果(図2a)、脊髄小脳変性症脊髄小脳変性症(SCA)31型モデルショウジョウバエの幼虫へ、分子「ナフチリジンカルバメートダイマー (NCD)」の給餌による複眼変性抑制効果(図2b)、さらに、CUGリピート結合分子JM642の創成に成功し、筋強直性ジストロフィーモデルマウスにて、スプライシング異常の回復(図2c)を、それぞれ個体レベルで確認した。

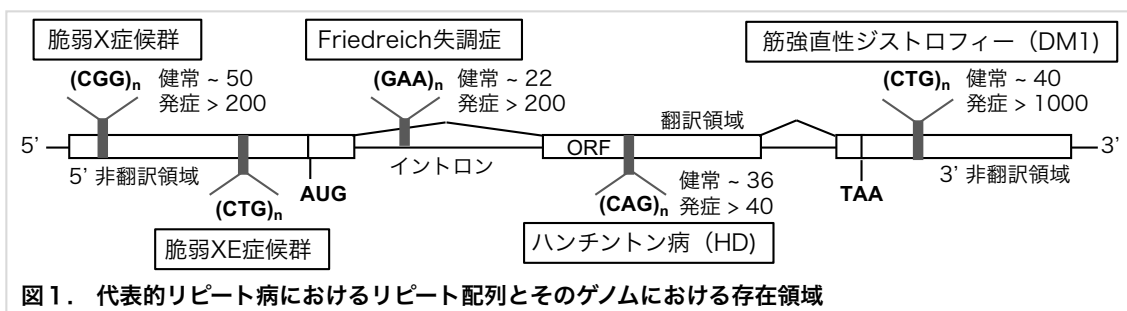


図1. 代表的リピート病におけるリピート配列とそのゲノムにおける存在領域

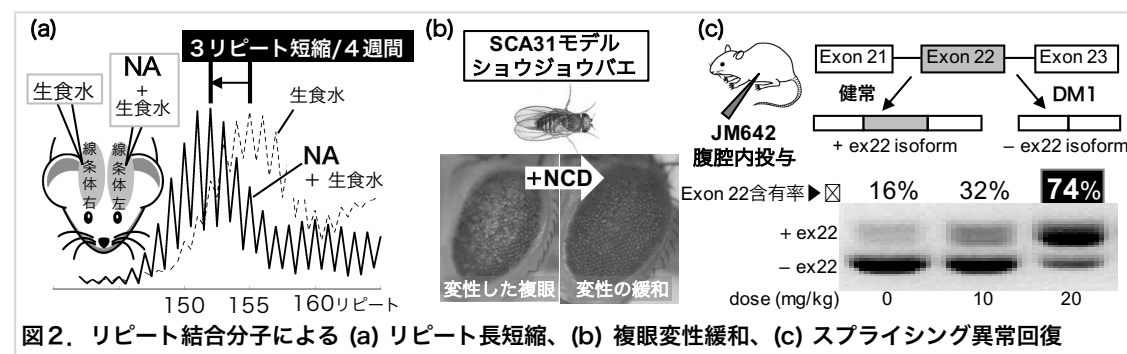


図2. リピート結合分子による (a) リピート長短縮、(b) 複眼変性緩和、(c) スプライシング異常回復

2. 研究の目的

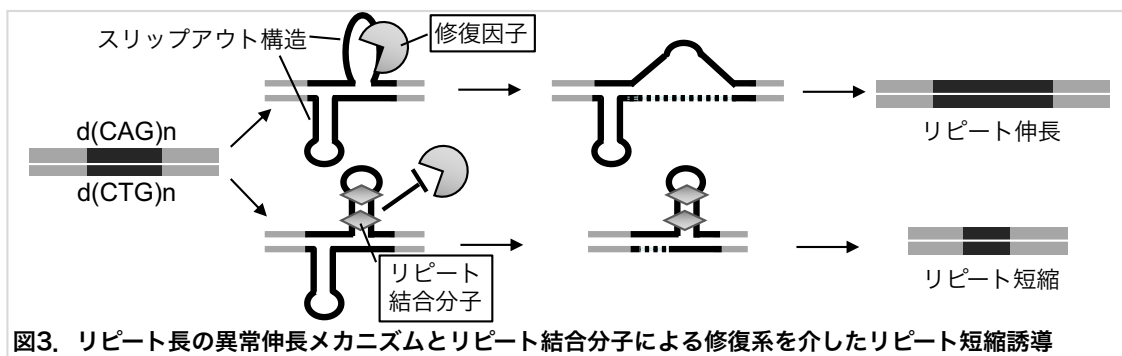


図3. リピート長の異常伸長メカニズムとリピート結合分子による修復系を介したリピート短縮誘導

これまでのリピート結合分子開発研究では、リピート配列への結合により「何らかの生体内プロセスへの効果」を「期待」し、運良く個体レベルでの効果が見出ししてきたが、「リピート結合分子はどういう分子機構で、個体レベルで活性を発現しているのか？」を詳細に理解することが、本提案課題の核心をなす学術的問いとして残っていた。一方、特別推進研究を開始した時点とは異なり、我々は個体レベルで活性を示す複数の化合物を持っていた。即ち、研究の次のステージとして、「生体内プロセスへの効果を積極的に発揮する分子の設計に着手するべき」と判断した。我々が開発したリピート結合分子のひとつであるNAのリピート短縮効果は、細胞が持つ修復系を介して発揮されていることが示唆された(図3)。すなわち、転写の際に形成されるd(CAG)リ

ピートのヘアピン構造（スリップアウト構造）にNAが結合し、その構造を固定することで、DNA修復因子による認識が変わって修復機構に影響を及ぼし、結果としてリピート長が短くなると考えられた。このことに着想を得て、「リピート短縮誘導を加速する、修復系を積極的に活性化する新規リピート結合分子」の創成を考えた。NAのハンチントン病モデルマウスでのリピート短縮効果は4週間で3リピート程度であり、運動機能などへの影響を調べるには、リピート短縮誘導の効率を格段に上げる必要があった。本提案研究では、特別推進研究の成果として手にした「個体レベルで効果が観察されるリピート結合分子」のリピート短縮誘導の分子機構を理解するため、また、より高次の表現型への影響を観察するために、「異常伸長した(CXG)_nリピートの短縮誘導を加速する新規リピート結合分子」の開発を目的とした。

3. 研究の方法

下記の課題について、研究を進めた。

1) NCD結合部位近傍での化学反応の加速効果の検討

リピート結合分子にCGGリピートに結合するNCDを選び、NCD結合部位近傍での化学反応の加速効果を、ビピリジニ-四酸化オスミウムによる酸化反応で検討した。NCDにビピリジン環を共有結合により結合させたNCD-Bpyを合成し、CGG/CGG, 5mCGG/CGG, TGG/CGG等に結合することを確認した後に、四酸化オスミウム存在化でのフリップアウトしたシトシン、5m-シトシン、チミンの酸化反応をHPLCにより追跡した。

2) 求電子性置換基を有するリピート結合分子NCD-epoxyの合成と反応

1)の結果に基づいて、フリップアウトしたシトシンをアルキル化するエポキシを有するNCD-epoxyを合成した。

3) シトシンデアミナーゼによるフリップアウトシトシンの修復系への影響検討

異常伸長リピートに特異的に結合し、リピート配列が形成するヘアピン内のシトシンをウラシルへ化学変換反応を加速する分子の創成を目指して、シトシンの3位窒素もしくは4位アミノ基を化学修飾できる化合物NCD-epoxyを合成し、その化学反応性とC→Uへの化学変換効率を調べてきたが、NCD-epoxyの化学的な不安定性のため、フリップアウトシトシンのデアミネーションについて検討した。

4. 研究成果

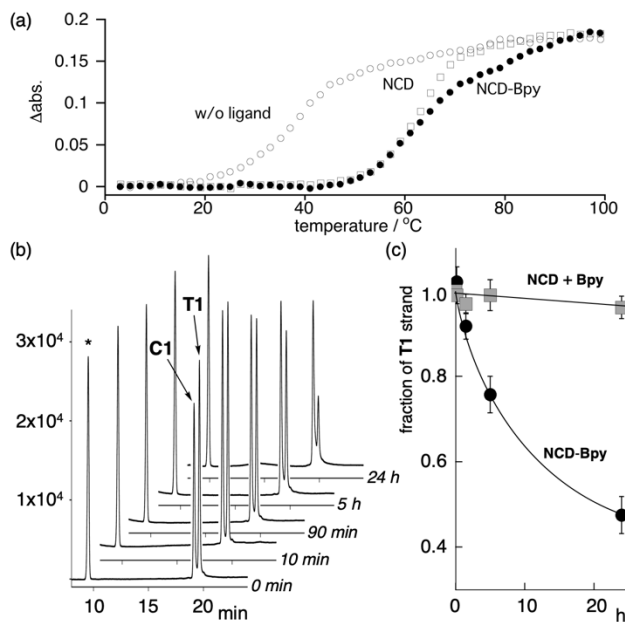
1) NCD結合部位近傍での化学反応の加速効果の検討

NCD-BpyがCGGリピート配列に結合することを確認するとともに、四酸化オスミウム存在化に、TGG/CGG配列のフリップアウトしたTを速やかにチミングリコールに酸化した。チミングリコールの生成は、チミングリコールを含むオリゴマーをビピリジン存在下に加熱して、DNA鎖を切断したのち、末端のリン酸基をアルカリフォスファターゼ処理により除いた後に、質量分析ならびに標品のオリゴマーとの比較により確認した。一方、シトシンや5-メチルシトシンでは、酸化反応は非常に遅く、酸化生成物を確認することはできなかった。これにより、NCDの結合によりフリップアウトした塩基が、近傍の反応剤との反応が加速されていることを明らかにした。

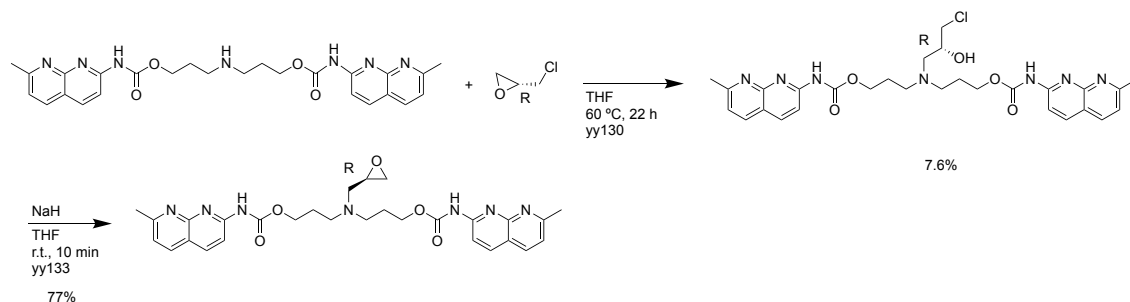
2) 求電子性置換基を有するリピート結合分子NCD-epoxyの合成と反応

NCDに対してエピクロルヒドリンを作用させる方法を用いて合成を検討したところ、収量は低かったが少量のNCD-epoxyを得ることができた。NCD-epoxyの化学的安定性を評価したところ、反応性の高いエポキシ基を有すること、また、エポキシ基と三級アミノ基との距離（原子数1）であることなどから、化合物自身の化学反応性が非常に高く、一方、安定性が低いことが明らかとなった。実際に、DNA二本鎖との反応もパイロット的に検討したところ、pH7.0のバッファー溶液中の化合物自身の分解半減期の間に、標的のCGG/CGG配列との化学反応が生じた可能性は低い可能性が示唆されている。pH条件などによる影響を引き続き検討するとともに、化学的不安定性の原因解明を行っている。

考えられる原因は、三級アミンによるエポキシ基の求核攻撃であると推測される。当初この三級アミノ基については、生理的条件においてプロトン付加を受けてアンモニウム塩となっているため、求核性は喪失していると考えていたが、分子内の求核的エポキシ基の開環反応が進行して

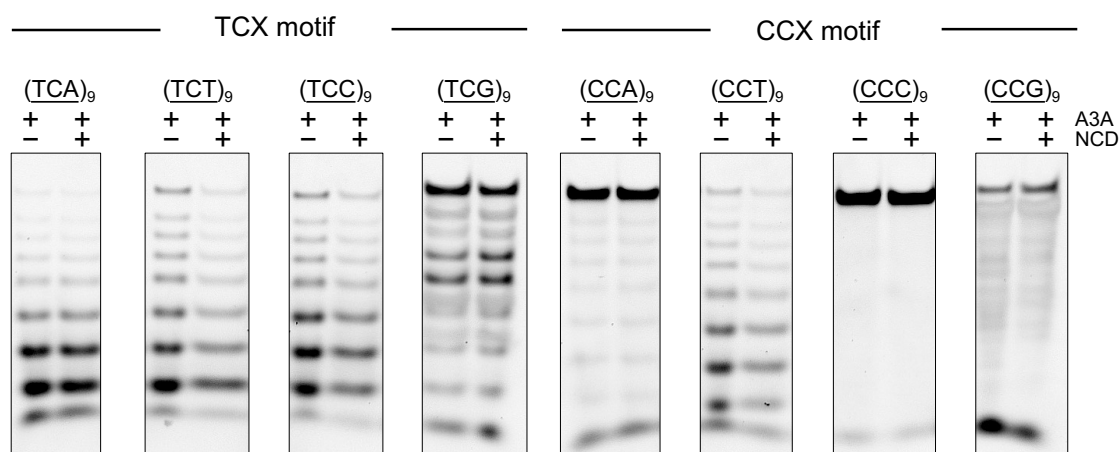


いる可能性がある。一方、NCD-epoxy のメチレン数を 2 に増やしたホモログも合成したところ、化学的安定性は向上したものの結合サイト近傍でのシトシンとの反応は観察できなかった。



3) シトシンデアミナーゼによるフリップアウトシトシンの修復系への影響検討

シトシンデアミナーゼ活性を持つ APOBEC ファミリー蛋白質を用いることにより、各種リピート配列におけるシトシンデアミネーションの効率を比較することが可能となった。その結果、リピートが形成するミスマッチを含むヘアピン構造において、G を含まない、もしくは G の含量が少ないリピート配列が、APOBEC ファミリー蛋白質の比較的良い基質となることがわかった。一方、CGG、CAG リピートなどは、あまりいい基質ではないことが明らかとなった。これらの知見を合わせ、ヘアピン構造形成時に C-C ミスマッチや T-T ミスマッチを形成するリピートなどが、本来の研究目的に最も良いリピート配列であることがわかった。CGG、CTG リピート配列に結合する低分子化合物を用いることにより、これら低分子が修復酵素系に及ぼす影響を見積もることが可能となることがわかった。



APOBEC A3 を反応させたリピート配列のゲル電気泳動図。NCD を添加しているがその効果はあまり認められなかった。これは、NCD の結合が弱いためと考えられる。今後、これらのリピート配列に結合する低分子を用いることにより、修復酵素系への低分子の影響を見積もることが可能と考察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Murata Asako, Mori Yuki, Di Yue, Sugai Ayako, Das Bimolendu, Takashima Yusuke, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Small Molecule-Induced Dimerization of Hairpin RNA Interfered with the Dicer Cleavage Reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 245 ~ 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furuzono Tomoko, Murata Asako, Okuda Satoshi, Mizutani Kenji, Adachi Tsuyoshi, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 36
2. 論文標題 Speeding drug discovery targeting RNAs: An iterative "RNA selection-compounds screening cycle" for exploring RNA-small molecule pairs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116070 ~ 116070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2021.116070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Dohno Chikara, Hagihara Masaki, Binti Mohd Zaifuddin Nursakinah, Nihei Mizuki, Saito Kaoru, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 57
2. 論文標題 Small molecule-induced trinucleotide repeat contractions during in vitro DNA synthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 3235 ~ 3238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CC00349F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Simeth Nadja A., Kobayashi Shotaro, Kobauri Piermichele, Crespi Stefano, Szymanski Wiktor, Nakatani Kazuhiko, Dohno Chikara, Feringa Ben L.	4. 巻 12
2. 論文標題 Rational design of a photoswitchable DNA glue enabling high regulatory function and supramolecular chirality transfer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 9207 ~ 9220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1SC02194J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Das Bimolendu, Murata Asako, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 49
2. 論文標題 A small-molecule fluorescence probe ANP77 for sensing RNA internal loop of C, U and A/CC motifs and their binding molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8462 ~ 8470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab650	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Konieczny Patryk, Mukherjee Sanjukta, Stepniak-Konieczna Ewa, Taylor Katarzyna, Niewiadomska Daria, Piasecka Agnieszka, Walczak Agnieszka, Baud Anna, Dohno Chikara, Nakatani Kazuhiko, Sobczak Krzysztof	4. 巻 49
2. 論文標題 Cyclic mismatch binding ligands interact with disease-associated CGG trinucleotide repeats in RNA and suppress their translation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 9479 ~ 9495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab669	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hagihara Masaki, Dohno Chikara, Saito Kaoru, Sugimoto Kazuhiro, Hishinuma Yuta, Sohma Yuri, Shibata Tomonori, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 50
2. 論文標題 Short Tandem Repeat Contractions during In Vitro DNA Synthesis by Repeat-binding Molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1848 ~ 1851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Deshmukh Amit Laxmikant, Caron Marie-Christine, Mohiuddin Mohiuddin, Lanni Stella, Panigrahi Gagan B., Khan Mahreen, Engchuan Worrawat, Shum Natalie, Faruqi Aisha, Wang Peixiang, Yuen Ryan K.C., Nakamori Masayuki, Nakatani Kazuhiko, Masson Jean-Yves, Pearson Christopher E.	4. 巻 37
2. 論文標題 FAN1 exo- not endo-nuclease pausing on disease-associated slipped-DNA repeats: A mechanism of repeat instability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110078 ~ 110078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.110078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Jun, Nakamori Masayuki, Okamoto Tatsumasa, Murata Asako, Dohno Chikara, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 26
2. 論文標題 The Dimeric Form of 1,3 Diaminoisoquinoline Derivative Rescued the Mis splicing of Atp2a1 and Clcn1 Genes in Myotonic Dystrophy Type 1 Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry, A European Journal	6. 最初と最後の頁 14305 ~ 14309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202001572	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yagi Yuki, Yamada Takeshi, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Chemical Probing of Thymine in the TGG/CGG Triad to Explore the Deamination of 5-Methylcytosine in the CGG Repeat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2679 ~ 2683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Tomonori, Nagano Konami, Ueyama Morio, Ninomiya Kensuke, Hirose Tetsuro, Nagai Yoshitaka, Ishikawa Kinya, Kawai Gota, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Small molecule targeting r(UGGAA)n disrupts RNA foci and alleviates disease phenotype in Drosophila model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 0000-0000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20487-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------